

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-266865

(43)Date of publication of application : 05.10.1999 ✓

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C07K 1/00
C07K 14/195
// C12P 21/00

(21)Application number : 10-070381

(71)Applicant : MARINE BIOTECHNOL INST CO
LTD
SEKISUI CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 19.03.1998

(72)Inventor : FURUYA MASAHIRO
MARUYAMA TADASHI

(54) CHAPERONIN OLIGOMER ORIGINATED FROM ARCHAEABACTERIUM, ITS PRODUCTION AND PRESERVATION, AND REGENERATION OF PROTEIN WITH THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for producing chaperonin oligomer originated from an archaeobacterium, capable of converting chaperonin monomer into the chaperonin oligomer, an active chaperonin useful for the regeneration, stabilization, heat stabilization, etc., of a useful protein, by treating the chaperonin monomer originated from the archaeobacterium with magnesium ion and a nucleotide.

SOLUTION: This method for producing chaperonin oligomer comprises treating chaperonin monomer originated from an archaeobacterium with magnesium ion (MgCl₂, etc.), and a nucleotide (adenosine triphosphate, etc.), to produce the chaperonin oligomer. The chaperonin oligomer is preserved and maintained in the presence of the magnesium ion and the nucleotide.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-266865

(43) 公開日 平成11年(1999)10月5日

(51) Int. Cl. 6 識別記号

C12N 15/09

C07K 1/00

14/195

// C12P 21/00

F I

C12N 15/00

C07K 1/00

14/195

C12P 21/00

A

C

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平10-70381

(22) 出願日 平成10年(1998)3月19日

(71) 出願人 591001949

株式会社海洋バイオテクノロジー研究所
東京都文京区本郷1丁目28番10号

(71) 出願人 000002174

積水化学工業株式会社
大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号

(72) 発明者 古谷 昌弘

岩手県釜石市平田第3地割75番1号 株式
会社海洋バイオテクノロジー研究所釜石研
究所内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 古細菌由来シャペロニンオリゴマー、その製造及び保存方法、並びにそれを用いた蛋白質の再生法

(57) 【要約】

【解決手段】 古細菌由来のシャペロニンモノマーから
シャペロニンオリゴマーを製造する方法、及び製造され
たシャペロニンオリゴマーを保存する方法。【効果】 古細菌由来のシャペロニンモノマーを、活性
型であるシャペロニンオリゴマーに効率的に変換し、維
持する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 古細菌由来のシャペロニンモノマーを、マグネシウムイオン及びヌクレオチドで処理してシャペロニンオリゴマーとすることを特徴とする古細菌由来のシャペロニンオリゴマーの製造方法。

【請求項2】 ヌクレオチドが、アデノシン三リン酸であることを特徴とする請求項1記載の古細菌由来のシャペロニンオリゴマーの製造方法。

【請求項3】 請求項1又は2記載の方法によって製造された古細菌由来のシャペロニンオリゴマー。

【請求項4】 古細菌由来のシャペロニンオリゴマーをマグネシウムイオン及びヌクレオチドの存在下で保存することを特徴とする古細菌由来のシャペロニンオリゴマーの保存方法。

【請求項5】 ヌクレオチドが、アデノシン三リン酸であることを特徴とする請求項4記載の古細菌由来のシャペロニンオリゴマーの保存方法。

【請求項6】 請求項3記載の古細菌由来のシャペロニンオリゴマーを用いて蛋白質を再生することを特徴とする蛋白質の再生法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、古細菌由来のシャペロニンオリゴマー、及びそれを製造し、保存する方法、並びにそれを用いて蛋白質を再生する方法に関する。シャペロニンは、蛋白質の折り畳み、安定化に関与する生体内因子であり、共存する他の有用蛋白質の安定化剤としての利用や遺伝子組み換え技術によって生産された有用蛋白質の再生行程への応用が期待されている。

【0002】

【従来の技術】シャペロニンは、蛋白質の折り畳み因子として知られ、それが有するATP分解活性と共役して蛋白質の耐熱化、再生のために働く機能を有する。このシャペロニンの機能は、有用蛋白質の再生、安定化及び耐熱化などに利用することができる。例えば、特開平7-67641号公報には、酵素を安定化する方法として、溶液中の酵素にヌクレオチド及びシャペロニンを添加し、酵素、ヌクレオチド及びシャペロニンの三者間の特異的相互作用を利用する方法が提案されている。

【0003】活性型のシャペロニンは、分子量約6万のサブユニット(モノマー)からなるオリゴマーであり、各サブユニットは2層の環状構造を形成する(Protein science, 1994, 3 1436-1443、バイオサイエンスとインダストリー Vol. 55 No. 9 (1997))。従って、シャペロニンの機能を有効に利用するためには、シャペロニンモノマーを活性型であるシャペロニンオリゴマーに効率的に変換し、そのオリゴマー構造を維持する技術が求められる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかし、従来の方法で

は、古細菌由来のシャペロニンを効率的に活性化することは困難であった。本発明は、このような従来の方法の問題を解決し、シャペロニンオリゴマーを効率的に製造し、保存する技術を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、古細菌由来のシャペロニンモノマーをマグネシウムイオン及びヌクレオチドで処理することにより容易にシャペロニンオリゴマーに変換できることを見だし、本発明を完成した。即ち、本発明は、古細菌由来のシャペロニンモノマーを、マグネシウムイオン及びヌクレオチドで処理してシャペロニンオリゴマーとすることを特徴とする古細菌由来のシャペロニンオリゴマーの製造方法である。

【0006】また、本発明は、上記記載の方法によって製造された古細菌由来のシャペロニンオリゴマーである。さらに、本発明は、古細菌由来のシャペロニンオリゴマーをマグネシウムイオン及びヌクレオチドの存在下で保存することを特徴とする古細菌由来のシャペロニンオリゴマーの保存方法である。さらに、本発明は、上記記載の古細菌由来のシャペロニンオリゴマーを用いて蛋白質を再生することを特徴とする蛋白質の再生法である。

【0007】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

(1) シャペロニンオリゴマーの製造方法

本発明の古細菌由来のシャペロニンオリゴマーの製造方法は、古細菌由来のシャペロニンモノマーをマグネシウムイオン及びヌクレオチドで処理することを特徴とする。シャペロニンモノマーとしては、例えば、スルホロバス(Sulfolobus)属、デスルホロコッカス(Desulfurococcus)属、ピロディクティム(Pyrodictium)属、サーモフィラム(Thermophilum)属、サーモプロテウス(Thermoproteus)属、ピロバキュラム(Pyrobaculum)属、ピロコッカス(Pyrococcus)属、メサノバクテリウム(Methanobacterium)属、メサノコッカス(Methanococcus)属、メサノピラス(Methanopyrus)属、メサノサーマス(Methanothermus)属、アーキアプロブス(Archaeoglobus)属、ハロバクテリウム(Halobacterium)属、メサノプラナス(Methanoplanus)属、メサノスピリラム(Methanospirillum)属、メサノサルシア(Methanosarcina)属の由来のものが使用でき、これらの中でもメサノコッカス・サーモリソトロフィカス(Methanococcus thermolithotrophicus)由来のシャペロニンオリゴマーを使用することが好ましい。

【0008】シャペロニンモノマーは、古細菌由来のシャペロニン遺伝子が大腸菌等を宿主として導入、発現させ、イオン交換、疎水性相互作用によるカラムクロマトグラフィーなどで組み換え型シャペロニンを精製することにより得られる。このようにして得られる組み換え型

シャペロニンとはモノマーとオリゴマーが混在しているが、望ましくはエチレンジアミン四酢酸・二ナトリウムのような金属キレート試薬で処理した後、緩衝剤のみで構成される緩衝液に前もって透析しておくことによって、組み換え型シャペロニンオリゴマーを、一旦モノマーへ解離しておくことが好ましい。ただし、このモノマーへの解離処理はどの精製ステップで行っても良い。

【0009】マグネシウムイオン及びヌクレオチドによる処理は、シャペロニンオリゴマーをマグネシウムイオン及びヌクレオチドを含む溶液に添加し、一定時間反応させることにより行い得る。マグネシウムイオンの供給源としては、塩化マグネシウムや硫酸マグネシウムなどが使用可能である。溶液中のマグネシウムイオンの濃度は特に限定されないが、1mM~1000mMとするのが好ましい。

【0010】ヌクレオチドとしては、アデノシン三リン酸(ATP)、アデノシン二リン酸(ADP)、シチジン三リン酸(CTP)、ウリジン三リン酸(UTP)、グアノシン三リン酸(GTP)などが使用可能であるが、好ましくはATPを使用する。ヌクレオチドの濃度は、0.01mM~10mMであることが望ましいが、少なくともシャペロニンオリゴマーのサブユニットモル数と同モル量以上になるようにするのが好ましい。また、溶液中には、好ましくは0.05-1.0M程度の硫酸アンモニウムもしくは、0.05-0.5 M程度のKClを共存させることが望ましい。これによってオリゴマーの生成効率を飛躍的に向上させることができる。

【0011】反応温度及び反応時間は特に限定されないが、反応時の温度は室温から60℃の間が好ましく、反応時間は5時間程度が好ましい。オリゴマー形成の確認は、ゲル濾過あるいは電子顕微鏡観察によって確かめることができる。再構成されたシャペロニンはそのまま、もしくは限外濾過等による凝縮後、安定保存可能である。このようにして得られる古細菌由来のシャペロニンは、真正細菌由来のシャペロニンよりも対象とする蛋白質に対する特異性が低く、汎用性が優れていると考えられる。古細菌の蛋白質折り畳み因子の種類は、大腸菌等の真正細菌と比較して少ないため、最小限の種類の折り畳み因子で蛋白質の折り畳みを発現するからである。

【0012】(2) シャペロニンオリゴマーの保存方法 本発明の古細菌由来のシャペロニンオリゴマーの保存方法は、シャペロニンモノマーをマグネシウムイオン及びヌクレオチドの存在下で保存することを特徴とする。古細菌の種類、マグネシウムイオンの供給源及びその濃度、ヌクレオチド及びその濃度は、上記の製造方法と同様のものでよく、また、保存液中には、0.05-1.0M程度の硫酸アンモニウムもしくは、0.05-0.5 M程度のKClを共存させることが好ましい。保存時の温度は特に限定されないが、-20~10℃といった低温で保存することが好ましい。

【0013】(3) 蛋白質の再生法

本発明の蛋白質の再生法は、古細菌由来のシャペロニンオリゴマーを用いることを特徴とする。より具体的には、古細菌由来のシャペロニンオリゴマーを含む溶液に変性した蛋白質を加え、一定時間反応させ、当該変性蛋白質を再生させることを特徴とする。反応溶液中のシャペロニンオリゴマーの濃度は特に限定されないが、0.1~1μMとするのが好ましい。なお、シャペロニンの供給源とする古細菌の種類は上記の製造方法と同様のものでよい。反応溶液中の変性蛋白質濃度も特に限定されないが、0.1~5μMとするのが好ましい。反応溶液中には、シャペロニンオリゴマーのほか、ATP、カリウムイオン、マグネシウムイオンを添加しておくのが好ましい。それらの濃度は特に限定されないが、それぞれ、0.1~5mM、1~500mM、0.1~100mMとするのが好ましい。反応温度及び反応時間は特に限定されないが、反応時の温度は15~80℃、反応時間は0.05~120時間とするのが好ましい。

【0014】

【実施例】以下、実施例により本発明を説明するが、本発明の範囲はこれに限定されるものではない。

【実施例1】メサノコッカス・サーモリソトロフィカス DSM2095 株由来のシャペロニン遺伝子を含む発現プラスミドpETTS1を大腸菌に導入し(この大腸菌は工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-16438として寄託されている)、これをLB培地(アンピシリンを含む)で37℃で培養した。培養液のOD650が1.5に達したところで、1mM IPTGを添加し、シャペロニン遺伝子の発現を誘導した。その後培養を3時間続け、菌体を遠心分離によって回収した後、緩衝液(50 mM Tris-HCl pH7.5, 5mM MgCl₂)に懸濁し、この懸濁液に対して超音波破碎処理を行った。処理液から菌体破碎物を除いたのち、65℃90分保温し、変性した大腸菌由来のタンパク質を沈殿除去した。得られた上清に(NH₄)₂SO₄を1.3M濃度になるように添加し、硫酸塩析を行った後、上清をTSKgel Ether-5PWによる疎水クロマトグラフィーにより精製した。シャペロニンに相当するサイズのタンパク質が存在するフラクションを回収し、25mM HEPES-KOH(pH 6.8), 5%グリセロール緩衝液で透析した。透析内液をTSKgel SuperQ-5PWカラムによる陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。シャペロニンに相当するサイズのタンパク質が存在するフラクションを回収した後、これを限外濾過によって濃縮し、濃縮液をTSKgel G3000SWXLカラムによるゲル濾過(流速: 0.5ml/min, 展開液: 25mM HEPES-KOH(pH 6.8), 25mM MgCl₂, 5%Glycerol)により精製し、シャペロニンを含むフラクションを得た。

【0015】得られたシャペロニンのフラクションを10 mM EDTA(エチレンジアミン四酢酸・二ナトリウム)で30分処理した後、25mM HEPES-KOH緩衝液(pH6.8)に対して4℃で一昼夜、透析を行った。透析内液を50mM MgCl₂、0.25mM ATP及び0.3M (NH₄)₂SO₄の存在下で30℃で5

時間処理し、シャペロニンオリゴマーの再構成を行った。処理後、一部をTSKgelG3000SWXLカラム（トソー社）によるゲル濾過、及び電子顕微鏡観察によってシャペロニンオリゴマー生成の確認を行った。ゲル濾過の展開液には50mM MgCl₂、0.25mM ATP、0.3M (NH₄)₂SO₄を含んだ25mM HEPES-KOH緩衝液（pH6.8）を用いた。再構成処理が施された後、ゲル濾過で溶出量がボイドボリュームを超えた直後にシャペロニンオリゴマーと思われるピークが現れた（図1）。また、このピークを示したフラクションをSDS-PAGE分析した結果、シャペロニンであることが判明した（図2）。さらにその構造を電子顕微鏡にて観察した結果、シャペロニン特有のリング構造を有していることが明らかとなった（図3）。これによって、シャペロニンオリゴマーへの再構成が確認された。

【0016】【実施例2】実施例1で得られたシャペロニンオリゴマー溶液を2mg/mlの濃度で4℃で30日間保存した後、電子顕微鏡観察によって調べた。その結果シャペロニンは遊離のオリゴマー以外にシャペロニンオリゴマーがリング面を介して重合してフィラメント構造を形成していた（図4）。しかし、このフィラメントはマグネシウムイオン及びATPの存在する条件下でもシャペロニンオリゴマー溶液の実用的濃度である0.5mg/ml濃度以下に希釈することによって解離した。従って、このフィラメントは可逆的の重合であることが確認された。

【0017】【実施例3】実施例1で得られたシャペロニンオリゴマーおよびシャペロニンモノマーのATPase活性を測定した。ATPase活性は、50mM HEPES-KOH、50mM MgCl₂、300mM KCl、2mM ATP からなる試験溶液に、シャペロニンオリゴマー12.5、25.0、若しくは50.0μg、又はシャペロニンモノマー50μg 添加し、温度65℃で測定した。その結果、シャペロニンオリゴマーについては濃度に依存的なATP分解が認められたが（図5）、シャペロニンモノマーについては明らかなATP分解は認められなかった。また、40-90℃の範囲でシャペロニンオリゴマーのATPase活性を測定した結果、至適温度は60-70℃であると認められた（図6）。

【0018】【実施例4】好熱性古細菌テルモプラズマ・アシドフィラム（*Thermoplasma acidophilum*）由来のクエン酸合成酵素（シグマ社）を、6Mグアニディウム塩酸を含む50mM HEPES-KOH緩衝液（pH7.5）に加え、50℃で30分間静置し、酵素を変性させた。次いで、実施例1で得られたシャペロニンオリゴマーを、50mM HEPES-KOH

緩衝液（pH7.5）に加え、60倍に希釈することにより再生反応をスタートさせ、経時的にクエン酸合成酵素の酵素活性を測定した。活性の測定は「Acta Chemica Scandinavica, 1963, 17, S129-134」の方法に従った。

【0019】再生反応は、ATP（最終濃度2mM）を最初から含ませておく場合と反応開始から10分後、途中で1/20容の400mM ATP を添加する場合との2種類行った。また、対照としてシャペロニンオリゴマーを加えない場合についても同様に活性を測定した。各反応液にはすべて300mM KCl 及び50mM MgCl₂が含まれるようにし、測定は50℃で行った。再生反応のクエン酸合成酵素およびシャペロニンオリゴマーの最終濃度はともに0.33μMとした。

【0020】その結果、反応開始時からシャペロニン及びATPが存在する場合は自発的な再生に比べて飛躍的に活性収率が增大した（図7）。また、ATPが存在しない状態ではシャペロニンは再生反応を抑制するが、ATP添加後、再生反応を促進することがわかった。このことから本発明によって得られる単一のサブユニットで構成される古細菌由来のシャペロニンがATP非存在下では再生中間体に結合し、ATPの存在によってこれを放出するという大腸菌GroEと同様の作用効果を示すことが判明した。

【0021】

【発明の効果】古細菌由来のシャペロニンモノマーを、活性型であるシャペロニンオリゴマーに効率的に変換し、維持する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【図1】再構成処理したシャペロニンのゲル濾過の結果を示す図である。

【図2】シャペロニンオリゴマーが含まれると予想される画分のSDS-電気泳動の結果を示す図である。

【図3】シャペロニンオリゴマーの電子顕微鏡写真である。

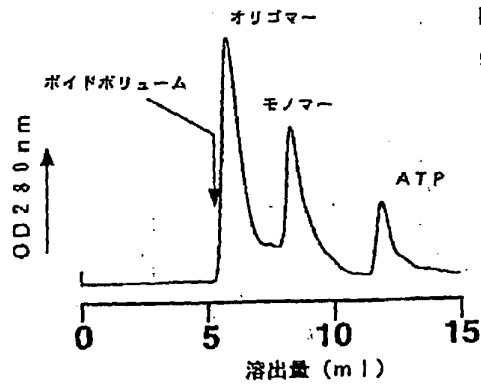
【図4】フィラメント構造を形成したシャペロニンオリゴマーの電子顕微鏡写真である。

【図5】添加したシャペロニンオリゴマーの量とATP活性との関係を示す図である。

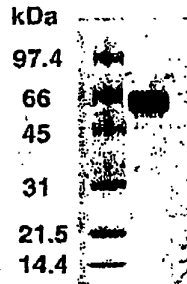
【図6】温度とシャペロニンオリゴマーのATP活性との関係を示す図である。

【図7】シャペロニンオリゴマーの添加の有無とクエン酸合成酵素活性との関係を示す図である。

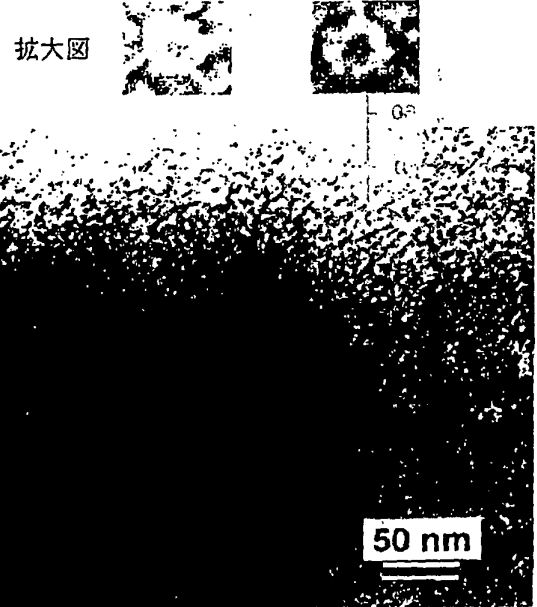
【図 1】



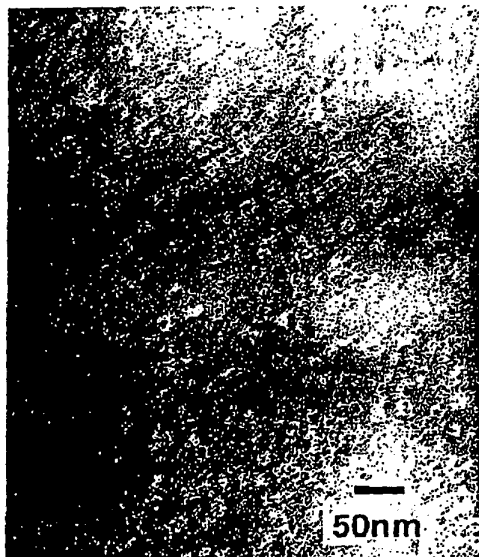
【図 2】



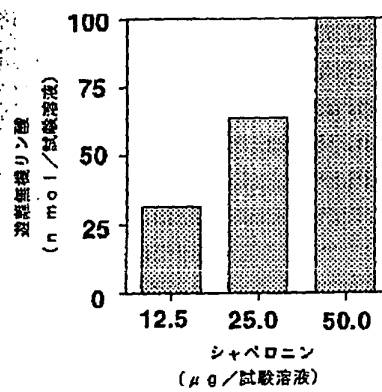
【図 3】



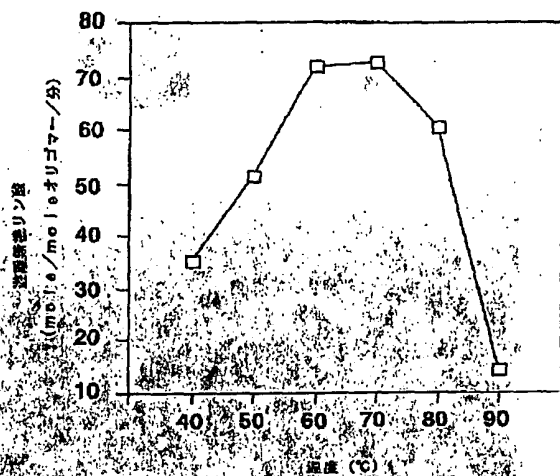
【図 4】



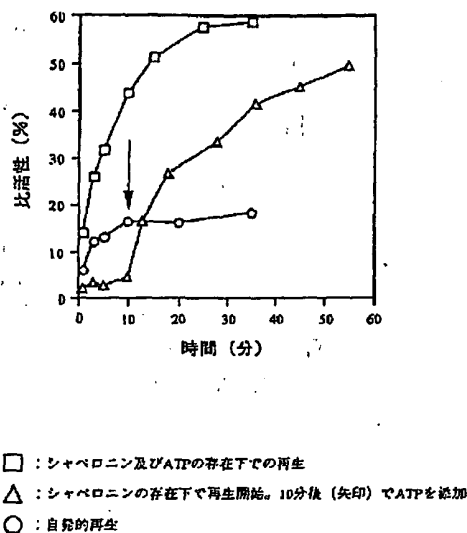
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【手続補正書】

【提出日】平成10年4月1日

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

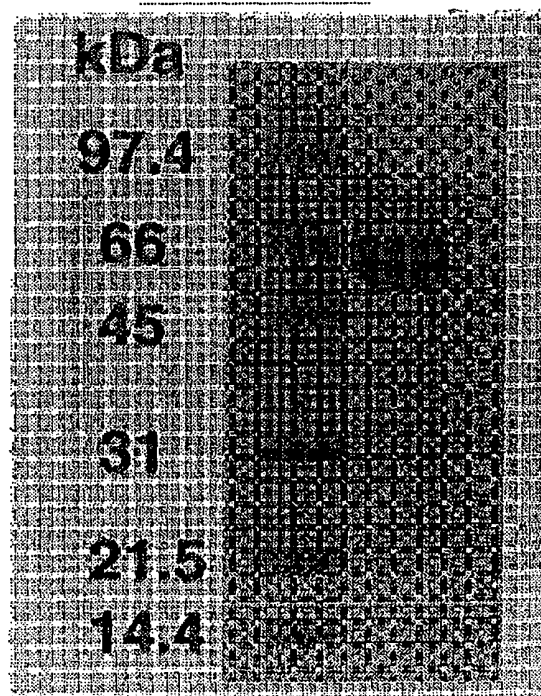
【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

【補正内容】

【図2】

図面代用写真



【手続補正3】

【補正対象書類名】図面

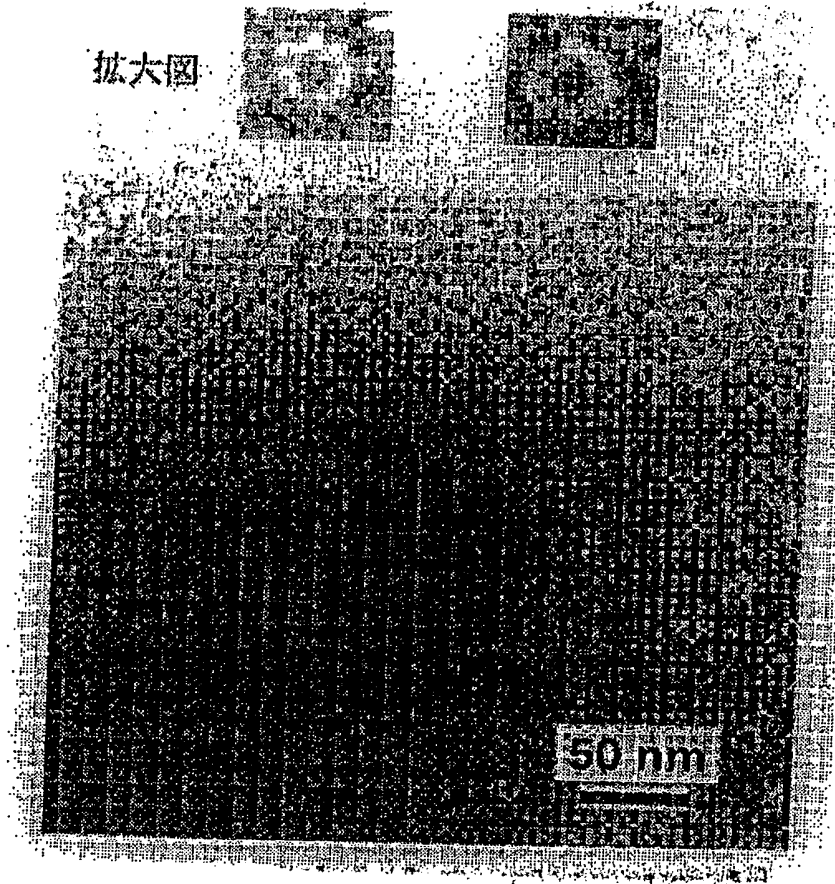
【補正対象項目名】図3

【補正方法】変更

【補正内容】

【図3】

図面代用写真



【手続補正 4】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 4

【補正方法】変更

【補正内容】

【図 4】

図面代用写真



フロントページの続き

(72)発明者 丸山 正
岩手県釜石市平田第3地割75番1号 株式
会社海洋バイオテクノロジー研究所釜石研
究所内